

新しい歯周炎予防・治療法としての310nm UVB-LEDの可能性

著者	伊田 鮎子
学位名	博士（歯学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成29年度
学位授与番号	30110甲第294号
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00064591/

新しい歯周炎予防・治療法としての 310 nm UVB-LED の可能性

-特に口腔細菌に対する殺菌作用の検討-

平成 29 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

高田 鮎子

要旨

紫外線 (UV) 照射装置は皮膚科分野で使用されており、ナローバンド UVB (311 ± 2 nm) は乾癬やアトピー性皮膚炎等、様々な皮膚疾患への効果が確認されている。しかしながら、歯科での応用は報告がない。また、265 nm 付近の短波長紫外線 (UVC) の殺菌作用はよく知られているが、UVB の口腔細菌への殺菌作用についての報告はほとんどない。そこで、310 nm UVB-LED 照射器 1, 2 を用いて、口腔細菌に対する殺菌作用と口腔上皮への傷害性の有無を評価し、同紫外線が歯周炎治療へ応用可能か否かを検討した。310 nm UVB-LED 照射装置を用い、口腔細菌 (*S. mutans*, *S. sauguinis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*) に対する殺菌作用を検討した。さらに細胞傷害性を歯肉上皮癌由来細胞株 (Ca9-22) にて検討した。また、口腔上皮細胞における活性酸素種 (ROS) の誘導の検討実験として、Ca9-22 細胞に UVB を照射後に NO の産生量を測定した。同様に、過酸化水素 (H_2O_2) の産生誘導も測定した。さらに ROS が口腔細菌に及ぼす影響として NO と H_2O_2 の殺菌作用を検討した。結果、310 nm UVB-LED 照射器 1 の 52.5 mJ/cm^2 以上の照射によって、*P. gingivalis* の生存率は 47 - 58%まで減少した。さらに 310 nm UVB-LED 2 を使用して高照射量を与えた結果、 1050 mJ/cm^2 の照射によって全ての供試細菌種において生存率が有意に低下した。また、バイオフィルムへの 1050 mJ/cm^2 の照射によって全ての供試菌の生存率が有意に減少した。265 nm UVC-LED の照射 (17 mJ/cm^2 : 10 秒間) によって Ca9-22 細胞は強く傷害されたが、310 nm UVB-LED は低い細胞傷害性を示した (210 mJ/cm^2 : 120 秒間)。また 310 nm UVB-LED の照射は、Ca9-22 細胞に NO と H_2O_2 の産生を誘導した。*P. gingivalis* はこれら ROS に対して強い感受性を示し他の菌よりも低い濃度で殺菌された。さらに照射による細菌の DNA 損傷を、シクロブタンピリミジンダイマー (CPD) 形成量を指標に測定した結果、*P. gingivalis* に多くの CPD が生成された。最後に細胞間接着因子の発現誘導を不死化口腔上皮由来細胞株 (OBA-9) へ 310 nm UVB-LED を照射後、Claudin-1 の発現を検討した。その結果、OBA-9 細胞に 310 nm UVB-LED を 105 mJ/cm^2 (6 秒間) 照射することによって Claudin-1 の発現が誘導された。以上の結果から 310 nm UVB-LED は大量の CPD 形成を誘導することで直接的な殺菌作用を示し、さらに上皮からの ROS 産生誘導により間接的な殺菌作用も期待できる。一方、宿主の上皮細胞に対しては低傷害性であり、細胞間接着因子の発現を誘導することでバリア機能を高める可能性があり、本機器は歯周炎の治療や予防への応用が期待される。

目次

I. 緒言	1
II. 材料と方法	2
【材料】	
1. 試作 310 nm UVB-LED 照射器 1, 2	2
2. 試作細菌	2
3. 歯肉上皮細胞	2
【方法】	
1. 殺菌作用 (浮遊培養菌系)	2
2. 細胞傷害作用 (バイオフィルム培養系)	2
3. 細菌 DNA の損傷	3
4. 細胞傷害作用	4
5. 活性酸素種の誘導	4
1) 一酸化窒素 (NO) の産生誘導	4
2) 過酸化水素 (H ₂ O ₂) の産生誘導	4
6. 活性酸素種による口腔内細菌の殺菌	5
7. 細胞間接着因子の発現誘導	5
統計分析	5
III. 結果	6
310 nm UVB-LED の殺菌作用	6
310 nm UVB-LEDの細菌DNA損傷	6
歯肉上皮細胞に対する傷害性	6
歯肉上皮細胞からの活性酸素誘導	7
歯肉上皮細胞からの活性酸素誘導	7
ROSによる殺菌作用	7
上皮細胞におけるClaudin-1の発現誘導	7
高線量 310 nm UVB-LED 照射による殺菌作用	7
上皮細胞における Claudin-1 の発現誘導	7
IV. 考察	8
V. 結論	13

謝辞 14

参考文献 15

表・付図 22

I. 緒言

310 nm 紫外線 (UV) は光線療法として皮膚科領域で広く使用されており，乾癬やアトピー性皮膚炎などに効果を示している (Lapolla et al., 2011; Gupta et al., 2013; Patrizi et al., 2015; Vangipuram & Feldman, 2016). UV はその波長の長さによって短いものから，UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm), UVA (315-400 nm) に分けられる．そのうち，UVA と UVB が皮膚疾患治療によく利用されている．ナローバンド UVB (NB-UVB) はその波長のピークが 310 nm 前後 (311 ± 2 nm) であり，ブロードバンド UVB (BB-UVB) (280-315 nm) よりも為害性が小さく，他の光線療法と比べ治療効果も高いとされる (Lapolla et al., 2011; Patrizi et al., 2015). さらに NB-UVB の安全性についてはすでに報告されている (Patrizi et al., 2015; Vangipuram & Feldman, 2016). UVA と増感剤であるソラレン (Psoralen) を使用した Psoralen + UVA (PUVA) 療法では副作用があるのに対し，NB-UVB の単独照射には副作用はなく，また UV 照射器のみを使用しているためコストも安い．またその作用機序として，乾癬やアトピー性皮膚炎の患者の皮膚において制御性 T 細胞 (Treg) を発現誘導し，その結果，過剰な免疫応答を抑制することが報告されている (Schweintzger et al., 2015). そのため，NB-UVB は歯周炎のような口腔粘膜疾患においても効果があると考えられるが，歯科における NB-UVB の応用例はまだない (Ebersole et al., 2014; Wang et al., 2014; Karthikeyan et al., 2015; Wang et al., 2015). さらに，殺菌灯で知られる 254 nm 付近の UVC は強い殺菌作用を持つことが知られている．DNA の UV 吸収のピークは 260 nm 前後にあり，DNA にピリミジン塩基の 2 量体であるシクロブタンピリミンダイマーを形成し DNA 障害を起こす．その DNA 障害が DNA の複製や転写を阻害し，細胞増殖を阻害し最終的に細胞死を起こすとされている (Svobodova et al., 2006; Batista et al., 2009a; Batista et al., 2009b; Jordan, 2015). UVB も同様の DNA 障害を起こすと考えられるが (Batista et al., 2009a; Batista et al., 2009b)，口腔細菌への殺菌作用についての報告はほとんどない．そこで，UVB も UVC と同様な殺菌作用があると考え口腔細菌への殺菌作用を調べるために口腔内用の 310 nm UVB-LED 照射器を試作した．本研究では UVB-LED 照射器の口腔細菌への殺菌作用とそのメカニズムを調べ，310 nm UVB-LED 照射器の口腔疾患における臨床応用の可能性を調べることにした．本研究は NB-UVB 機器の口腔内への応用を検討した初めての研究である．

II. 材料と方法

【材料】

1. 310 nm UVB-LED 照射機 1, 2

照射器は日機装 (株)より提供されたものを使用した (図1). 照射装置はペンタイプの照射部とUV コントローラー (印加電流設定を行う) とACアダプタからなる. 細菌または細胞への照射量は以下の式で求めた: 照射量 (mJ/cm^2) = 照射照度 (mW/cm^2) \times 照射時間 (秒). 青色LED光源から約10 mm下の96 well プレートのウェルの底面に照射された時の照射量を表1に示す. また, 陽性コントロールとして, 265 nmのUVC-LED照射器も使用した. 照射器2は1を改良し, 高線量 ($1050 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) での照射が可能になっている.

2. 供試細菌

American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入した*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277^T, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586^T, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556^T, *Streptococcus mutans* ATCC 25175^Tの口腔細菌4種を使用した. *P. gingivalis* と *F. nucleatum* は変法GAM培地 (ニッスイ, 東京) と変法GAM寒天培地に, *S. sanguinis* と *S. mutans* はBHI 培地 (Becton Dickinson, Franklin Lakes) とBHI 寒天培地にそれぞれ播種した後, アネロパック嫌気 (三菱ガス, 東京) を入れた嫌気ジャーで, 嫌気条件下 37°Cにて培養した.

3. 歯肉上皮細胞

ヒト歯肉上皮がん由来細胞株Ca9-22細胞 (理研バイオリソースセンター, 茨城) を使用し細胞傷害性と活性酸素種の産生誘導実験を行った. Ca9-22細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) に10%ウシ胎児血清 (Hyclone Laboratories, Inc, Logan, UT), 100 U/ml ペニシリンと 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを添加した培地で 5% CO₂, 37°Cにて培養した.

不死化口腔上皮由来細胞株OBA-9細胞 (大阪大学の村上伸也先生から恵与される) を用いて, 細胞間接着因子の発現誘導の実験を行った. 同細胞はHumedia-KG2 (クラボウ, 大阪) で 5% CO₂, 37°Cで培養した.

【方法】

1. 殺菌作用 (浮遊培養菌系) : 310 nm UVB-LED照射器1, 310 nm UVB-LED照射器2

全ての細菌は各液体培地にて1 - 2日間嫌気下で培養後、新鮮な培地に継代し、24時間さらに培養した。各菌液を $8000 \times g$ で10分間遠心分離し、PBSで1回洗浄後、OD600が0.4 - 0.5となるようにPBSにて調製した。各菌液は96 wellプレートの各ウェルに100 μ lずつ添加した後、310 nm UVB-LED照射器1を用いて各照射量 (17.5, 52.5, 105, 210 mJ/cm^2 : 10, 30, 60, 120秒間) 照射した。その後、菌液を段階希釈して各寒天培地に塗抹、嫌気下で1 - 7日間培養、形成されたコロニーを計測してCFU/mlを算出した。生存率の求め方は以下の通りとした。生存率 = colony forming unit (CFU) /ml (17.5, 52.5, 105, 210 mJ/cm^2 : 10, 30, 60, 120秒間照射群) / CFU/ml (0 mJ/cm^2 : 0秒間照射群) \times 100。同様に、310 nm UVB-LED照射器2を用いて高線量の各照射量 (315, 420, 1050 mJ/cm^2 : 12, 24, 60秒間) を各菌液に照射して生存率を求めて殺菌作用を評価した。

2. 殺菌作用 (バイオフィーム培養系) : 310 nm UVB-LED照射器2

バイオフィーム培養系：各菌のバイオフィームを96 wellプレートに (Yamaguchi et al., 2013) と (Ge et al., 2008) の方法を参考に作成した。各菌液を*P. gingivalis*はOD600 = 1.0, その他の菌はOD600 = 0.4 - 0.5にPBSでそれぞれ調製した。その後、滅菌唾液：*P. gingivalis*菌液 = 1 : 5の割合で、その他は菌液：培地 = 1 : 100の割合でそれぞれウェルに添加し一晩培養した後、バイオフィームの形成を確認した。滅菌唾液はヒトの唾液を孔径 0.20 μm の滅菌フィルター (Minisart Single use filter unit. Non-pyrogenic ; sartorius stedim, Goettingen, Germany) を用いてろ過滅菌したものを使用した。それぞれのバイオフィームをPBSにて穏やかに洗浄した後、各線量 (315 mJ/cm^2 ; 12秒間, 420 mJ/cm^2 ; 24秒間, 1050 mJ/cm^2 ; 60秒間) の310 nm UVB-LEDを照射した。その後バイオフィームを剥離、超音波にて攪拌、段階希釈した後に各種寒天平板培地に塗布し1 - 7日間嫌気培養した。その後、形成されたコロニー数を計測しCFUを求めたのちに、生存率を求めて殺菌作用を検討した。

3. 細菌 DNAの損傷

310 nm UVB-LED照射によって生じる各細菌のDNA損傷を、シクロブタンピリミジンダイマー (CPD) の形成量を指標にELISAで測定した。PBSでOD600 = 0.65に調整した各菌液を96 wellプレートに添加した後、310 nm UVB-LEDを1050 mJ/cm^2 (60秒間) 照射した。その後各菌からDNAを熱抽出法 (UDO REISCHL et al., 2000; S.P.Tongeren et al., 2012)

により分離した。照射後の菌液を遠心 ($10000 \times g$ で1分間と $12000 \times g$ で3分間) した後、沈渣をTE緩衝液に懸濁、 95°C で10分間加熱処理した。その後、 $12000 \times g$ で1分間遠心し、上清をDNAサンプルとした。その後各DNAサンプルをHigh Sensitivity CPD ELISA kit Ver. 2 (コスモバイオ, 東京) を用いて、CPDを計測した。

4. 細胞傷害作用

96 wellプレートにCa9-22細胞を 2×10^4 細胞/wellずつ添加し一晩培養した。培地を取り除きPBSで洗浄してPBSを各ウェルに $100 \mu\text{l}$ 添加し、異なる照射量 (0, 17.5, 52.5, 105, $210 \text{ mJ}/\text{cm}^2$: 0, 60, 120, 180, 240秒間) で、UV (UVBとUVC) を照射した。その後、PBSを培地に置換して24時間培養した細胞の細胞内ホルマザン生成量をCell Counting Kit-8 (同仁化学, 東京) を用いて計測し、細胞傷害性を検討した。

5. 活性酸素種の誘導

1) 一酸化窒素 (NO) の産生誘導 : 8ウェルチェンバースライド (Thermo Fisher Science, Waltham, NY) にCa9-22細胞を単層培養し、PBS下にて310 nm UVB-LED1を60秒間照射 ($105 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) した後に培地に交換し、24時間培養した。その後に産生されたNOをNO検出試薬のDAF2-DA (積水メディカル, 東京) を用いて染色した。さらに同細胞における誘導型NO合成酵素 (iNOS) の発現を抗iNOS抗体 (ab178945: Abcam, Cambridge, UK) を用いた免疫染色で検討した。また、iNOSのmRNAの発現をReal-time PCRにて検討した。Ca9-22細胞を単層培養し、PBS下にてUVBを60秒間照射した後に培地に交換し、24時間培養した。TRIzol試薬を用いて、製造業者 (Life Technologies) の指示に従って、total-RNAを細胞から抽出した。相補DNAはReverTra Ace- α (TOYOBO, 大阪) を用いてtotal-RNAから合成した。SYBER green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO, 大阪) を用いてリアルタイムPCRを行い、iNOSの発現を分析した (ハウスキーピング遺伝子 : GAPDH)。 95°C で変性し40サイクル行なった。iNOSのプライマーは5'-TCT GCTGGCTTCTGTTCT-3' (forward) および5'-CTG TCCTTCTTCTTCGCCTCGTA-3' (reverse), GAPDHのプライマーは5'-TTT GGT ATC GTG GAA GGA CTC A-3' (forward) および5'-ATC TCG GGT GTG GTA GGT GA -3' (reverse) とした。RNA発現レベルは $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用いて比較した。

2) 過酸化水素 (H_2O_2) の産生誘導 : 単層培養したCa9-22細胞にKrebs-Ringer phosphate緩衝液 (145 mM NaCl, 5.7 mMリン酸ナトリウム, 4.86 mM KCl, 0.54 mM CaCl, 1.22 mM MgSO_4 , 5.5 mMグルコース, pH 7.35) 下にて310 nm UVB-LED1を60秒間 ($105 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) 照射後、同細

胞における H_2O_2 の産生量をAmplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen, California, USA) を用いて計測した.

6. 活性酸素種による口腔内細菌の殺菌

PBSにて $\text{OD}_{600} = 0.4 - 0.5$ に調製した各菌液に各濃度のNO (NO供与体: DEA NONOate $10 \mu\text{M}$) と H_2O_2 $1 \mu\text{M}$, 1 mM を添加し1時間作用させた. 菌液を適宜希釈した後, 寒天に塗布・培養して, 形成されたコロニー数を計測しCFUを求めたのちに, 生存率を求めて殺菌作用を検討した.

7. 細胞間接着因子の発現誘導

96 wellプレートに単層培養したOBA-9細胞にPBS下で 52.5 mJ/cm^2 (3秒間), 105 mJ/cm^2 (6秒間), および 157.5 mJ/cm^2 (9秒間) の 310 nm UVB-LEDを照射した後, Humedia-KG2に培地を交換し, 48時間培養した. その後, 細胞からタンパク質を抽出し, 同細胞におけるClaudin-1のタンパク発現をウエスタンブロッティング法で検討した. 全てのタンパク質はRIPA緩衝液 (50 mM Tris-HCl [PH 7.4], 150 mM NaCl, 1% TritonX -100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 10 mM NaF) (Bagaitkar et al., 2010; Shikama et al., 2015) で抽出し, BCA Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC) で濃度を測定した後に使用した. 各抽出試料 $5 \mu\text{g}$ を 15% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し, 20 mA 定電流, 80 V の条件で電気泳動した. 泳動終了後, ゲル中のタンパク質をPVDF膜 (polyvinylidene difluoride, MILLIPORE) にセミドライ法で転写した. その後, PVDF膜を 5% スキムミルクにて室温で1時間ブロッキングした後, 抗Claudin-1 ポリクローナル抗体 (ab15098: Abcam, Cambridge, UK) (一次抗体) を添加して, さらに 4°C で約15時間インキュベートした. PBSTでPVDF膜を15分間で1回, 5分間で3回洗浄した後, HRP標識 anti-Rabbit IgG 抗体Code No.17502:IBL, 群馬) を 1% スキムミルク (PBS) に希釈した後, PVDF膜に添加し, 室温で1時間作用させた. その後, PBSTにてPVDF膜を15分間で1回, 5分間で3回洗浄後, 増強化学発光検出キット (ImmunoStar LD, 和光純薬) を用いて, Claudin-1のバンドを検出した.

統計分析

全ての結果は統計ソフトにて平均値 \pm 標準誤差を算出した. また, 対照群と実験群間の有意差はANOVA,またはstudentのt検定で解析し, $p < 0.05$ を有意差ありとした.

Ⅲ. 結果

310 nm UVB-LEDの殺菌作用

310 nm UVB-LEDの口腔細菌の浮遊菌に対する殺菌作用を図2, 3にそれぞれ示した. 310 nm UVB-LEDの52.5 mJ/cm²以上の照射によって, *P. gingivalis*の生存率は47 - 58%まで減少した. *F. nucleatum* は210 mJ/cm² (120秒間) の照射で57.2%まで減少した. さらに, *S. sanguinis*は17.5 mJ/cm² (10秒間) の照射で36 - 50%に, *S. sanguinis* は105 mJ/cm² (60秒間) の照射で 52 - 58%にそれぞれ生存率が減少した (図2). 一方で, 265 nm UVC-LEDを17.7 mJ/cm² (10秒間) 照射することで, 全ての供試菌の生存率が3%以下まで減少した (データ示さず). さらに310 nm UVB-LED 2を使用して高照射量を与えた結果, 1050 mJ/cm² (60秒間) の照射によって全ての供試細菌種において生存率が有意に低下した(図3). *P. gingivalis*のCFU値は, 420 mJ/cm² (24秒間) の310 nm UVB-LED照射によって26.9%まで生存率の減少を示し, 1050 mJ/cm²の照射によって4.3%まで減少した. *F. nucleatum* の生存率は420 mJ/cm²の照射によって65.8%まで, 1050 mJ/cm²の照射で36.4%までそれぞれ減少した. *S. mutans*と*S. sanguinis* の生存率は1050 mJ/cm²の照射により39.6%と49.1%までの減少をそれぞれ示した. 次に, 口腔細菌のバイオフィルムへの殺菌作用について検討した. その結果, 420 mJ/cm²または1050 mJ/cm²の照射によって*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *S. sanguinis*, *S. mutans* の全ての供試菌の生存率が有意に減少した (図4).

310 nm UVB-LEDの細菌DNA損傷

310 nm UVB-LEDの照射 (1050 mJ/cm²) によって, 菌体内に生成されるCPDを測定した. その結果, 全ての供試菌で照射群は非照射群と比較して有意にCPDが形成された. 特に, *P. gingivalis*においては他3菌と比較してより多くのCPDが形成された (図5).

歯肉上皮細胞に対する傷害性

310 nm UVB-LEDの105 mJ/cm²の照射では, Ca9-22細胞に対する有意な傷害作用は示さず, 210 mJ/cm²以上の照射で傷害作用を示した (図6). 一方, 265 nm UVC-LEDは105 mJ/cm²の照射で, Ca9-22細胞に対し強い細胞傷害性 (生存率10%以下) を示した. また, 310 nmと265 nmのUV照射におけるCa9-22細胞のLD50 (半数致死量) はそれぞれ401.8 mJ/cm² (229.6秒) と57.0 mJ/cm² (32.2秒) であった.

歯肉上皮細胞からの活性酸素誘導

310 UVB-LEDで歯肉上皮細胞 (Ca9-22細胞) からROS産生が誘導されるかどうかをDAF2-DA蛍光を使って調べた。その結果、310 nm UVB-LEDを照射 (105 mJ/cm²) することによって、Ca9-22細胞のDAF2-DA蛍光の増加が認められた。DAF2-DAはアミノ基がNOと反応して緑色の蛍光を発する蛍光試薬であることからNOの産生が誘導されることが示唆された。310 nm UVB-LEDをCa9-22に105 mJ/cm²の照射量を与えた群は非照射群と比較し、NOの産生がNOと反応したDAF2-DA (NO検出試薬) が蛍光発色して観察された (図7の (A))。さらにNOの産生が照射群において有意に多く産生されたことが示された。(図7の(B))。また、iNOSタンパクは免疫染色によって照射群において多く形成された傾向を示した (図8)。iNOSのmRNAの発現においても対照群で多く形成された傾向を示した (図9)。さらに、310 nm UVB-LEDの105 mJ/cm²照射後の1 - 6時間のCa9-22細胞に、H₂O₂の産生増強がみられた (図10)。

ROSによる殺菌作用

供試口腔細菌に対する活性酸素種の殺菌作用を調べた。NO供与体であるDEA NONOate (10 μM) を細菌培養液に添加し、1時間作用させた結果、*P. gingivalis*の生存率が56%まで減少した。一方、*F. nucleatum*, *S. sanguinis*, *S. mutans* の生存率は、有意な低下はみられなかった (図11)。また、*P. gingivalis* と *S. mutans* は 1 μM H₂O₂の添加によって生存率が50%まで減少したのに対し、*F. nucleatum* と *S. sanguinis*は減少しなかった。一方、1 mM H₂O₂の添加で、*S. sanguinis*の生存率は50%まで抑制された (図12)。

上皮細胞におけるClaudin-1の発現誘導

OBA-9細胞に310 nm UVB-LEDを照射 (52.5, 105, 157.5 mJ/cm²) した後、細胞を回収し同細胞における Claudin-1タンパクの発現をウエスタンブロット法で解析した。実験は独立して3回行い、解析は同時に行った。そのうちの1例を結果に示した (図13)。その結果、各照射群で、同細胞にClaudin-1の発現が誘導された。

IV. 考察

本研究において310 nm UVB-LEDは口腔細菌へ殺菌作用を示した。低線量 (105 mJ/cm²) の310 nm UVB-LED照射 (試作1号機による照射) による口腔細菌への殺菌作用は弱いことが示されたが、高線量の (420 - 1050 mJ/cm²) 310 nm UVB-LED (試作2号機による照射)では、浮遊菌培養での殺菌作用に加えて、バイオフィルムを形成した口腔細菌に対しても殺菌作用があることが示された。310 nm UVB-LEDの直接的な殺菌作用として考えられるのはDNAの障害によるものと考えることができる。254 nm 付近のUVCは殺菌灯として利用されており、UVCによって生物のDNAに主にシクロブタンピリミジンダイマー (CPD) を形成することでDNA複製を阻害し、増殖を抑制し、最終的に細胞死を引き起こすことが報告されている (Rastogi et al., 2010; Polefka et al., 2012)。

本研究でも、265 nmのUVC-LEDは310 nm UVB-LEDと比べて口腔細菌に強い殺菌作用を示した。紫外線全般による人を含む生物のDNAの障害にはDNAの酸化、脱アミノ化、加水分解、DNA鎖の切断など様々なものがあるが、UVBによるものは主にチミン2量体の形成によるものであり、CPDの他にも6-4光産物やデュワー型光産物のDNA障害を起こすことがわかっている (Douki T, 2000; Perdiz et al., 2000; Batista et al., 2009a)。

310 nm UVB-LED照射によっても、これらのDNA障害が本実験で使用した口腔細菌に対しても起こったため、殺菌されたと考えられる。とりわけ、*P. gingivalis*にCPDが多く形成されたことから、より強く殺菌されたと考えることができる。一方、310 m UVB-LED照射による6-4光産物の形成量測定の結果では、*F. nucleatum*では有意に6-4光産物が形成され ($p < 0.05$) (データ示さず)、*S. sanguinis*においても形成される傾向を示した ($p = 0.065$) (データ示さず)。*F. nucleatum*はCPDの形成量は他の菌より少なかったが6-4光産物は多く形成されたことになる。

また、デュワー型光産物の形成量測定の実験では、310 nm UVB照射によって*S. mutans*のDNAにデュワー型光産物が有意に多く形成された ($p < 0.05$) (データ示さず)。310 nm UVB-LEDによるDNA障害によって形成される主な2量体はCPDであるとされているが、6-4光産物やデュワー型光産物の2量体はその修復がCPDよりもされにくいことや、細胞死への誘導よりも変異との関係が強いとも言われており (Perdiz et al., 2000)、*P. gingivalis*以外の3菌はこれら2量体の形成が殺菌作用や菌体の増殖や変異に関わっている

可能性も考えられる。結果として、DNAの障害としてCPDの形成が口腔細菌の直接的な殺菌作用に関わっていた可能性があり、*P. gingivalis*が310 nm UVB-LED照射によってより強く殺菌された理由であるかもしれない。

一方、310 nm UVB-LEDの細胞への照射実験では、単層の歯肉上皮培養系において、210 mJ/cm²を超える照射量で傷害がみられたが、105 mJ/cm²以下の照射量では傷害性を示さなかった。また、単層の歯肉上皮細胞培養系に対するLD50の310 nm UVB-LED の照射量は401.8 mJ/cm²であることが本研究でわかった。口腔上皮の最表層には角質層が重層構造をなしているため、口腔内ではさらに照射線量を多くすることが可能と考えられ、殺菌作用の増強が期待できる。本実験では単層培養の細胞への照射実験であった。そのため、重層培養された皮膚モデルの培養系を利用することで臨床応用を想定した安全な照射量の検討が可能であるので今後の課題としたい。

また、310 nm UVB-LEDは細胞傷害性のない照射量 (105 mJ/cm²) を上皮細胞に与えることで活性酸素種 (ROS) の産生を誘導することが明らかとなった。ROSは生体内で代謝産物として常に産生されているものであるが、電離放射線や重金属、紫外線などの外因刺激によっても生じることがわかっており、UV照射によって細胞から一酸化窒素 (NO) やその他活性酸素の産生が誘導されることもわかっている (Schallreuter et al., 1999; Chang et al., 2011)。

本研究では310 nm UVB-LED照射によって歯肉上皮細胞からNOと過酸化水素の産生が確認された。上皮細胞より発生した過酸化水素は、検出試薬の性質を考慮すると細胞内のミトコンドリアによって産生され放出されたものと考えられる (Polefka et al., 2012)。本実験の結果では低濃度 (1 μM) の過酸化水素が*P. gingivalis*に殺菌作用を示した。成人男性の通常血中濃度が100 – 600 μM (Munn. et al., 2003) であることより病的な量の高濃度の過酸化水素での殺菌作用はどうであるのかの疑問があったため、実験では1 mMでも検討した。310 nm UVB-LED照射によって上皮から産生された過酸化水素は約10 μM (図10) であったことより、歯肉上皮細胞から継時的に産生された活性酸素が間接的な殺菌作用を示す可能性が考えられる。

同様に歯肉上皮細胞からNOの産生が確認された。また、*P. gingivalis*が低濃度のNOで殺菌されることも明らかとなった。よって、310 nm UVB-LED照射によって歯肉上皮細胞から産生誘導されたNOが間接的な殺菌作用を示す可能性がある。UVの照射によってマクロファージ細胞や上皮細胞にiNOSが誘導されることが知られているため、歯肉上

皮細胞でも同様のことが起こったと考えられる。本研究でも歯肉上皮細胞への310 nm UVB-LED照射群と非照射群においてiNOSの免疫染色によるタンパク質発現と、iNOSのmRNAの発現をReal-time-PCRで調べた結果、照射群においてiNOS発現の上昇傾向が確認された (図8, 9)。

これらのROSが偏性嫌気性菌である歯周病原菌の殺菌や増殖抑制に寄与する可能性があり、とりわけ*P. gingivalis*はROSへの感受性が高いことが示唆された。加えて、UVによるDNA障害の指標であるCPDが*P. gingivalis*に多く形成されることが示された。以上のことから、*P. gingivalis*は310 nm UVB-LED照射によって、他の菌より高感度に殺菌される可能性が示唆され、歯周炎治療への応用が期待できる。*P. gingivalis*のような歯周病原菌はROSへの感受性が高いことが従来より報告されている (Lynch & Kuramitsu, 1999; McKenzie et al., 2012)。その一方で *Streptococcus*属はROSに対して抵抗性を持つことが報告されている (Kreth et al., 2008; Henningham et al., 2015)。実際、本研究の結果でも*P. gingivalis*は低濃度のNOとH₂O₂で殺菌されたが、*S. sanguinis*はこれらROSには殺菌されなかった。また、本研究で用いたもう一種の歯周病原菌である*F. nucleatum*もROSへの感受性があることを想定していたが、結果的にはROSへの感受性は低かった。

*Fusobacterium*属は菌種によってはROSや様々な口腔内環境への適応能力が高いことが報告されていることから (Signat et al., 2011)、本研究で用いた *F. nucleatum* は310 nm UVB-LEDによって殺菌されにくかった可能性がある。間接的な殺菌作用としては以上のことが考えられた。体内でのROSは過剰になると様々な酸化ストレスを引き起こすが、生理的低濃度であれば細胞内のシグナリングの2次メッセンジャーとしても必要不可欠である。さらにiNOSから産生されるNOが殺菌的な役割も果たすとの報告もある (Buerk. et al., 2011)。細胞傷害性の少ない範囲で口腔上皮細胞より発生するこれらのROSが口腔細菌への間接的な殺菌作用を示すと共に、歯周組織において防御的な作用増強のために働く可能性も考えられる。

光線力学療法 (aPDT) の歯周治療への応用の報告はこれまでに数多くなされており、新しい治療法としての関心が高まっている (Braun et al., 2008; Shintani et al., 2008; Sgolastra et al., 2013; Haag et al., 2015; Fyrestam et al., 2017; Ren et al., 2017)。各種波長の電磁波が、口腔細菌に対して殺菌作用を示すことがいくつか報告されている (Kim et al., 2013; Cieplik et al., 2014)。例えば、425 nmの可視光は*P. gingivalis*への殺菌作用があるとの報告がある (Kim et al., 2013)。しかし、殺菌作用を発揮するには、照射線量を多くす

るために照射器も大きくする必要があった。一方、我々の試作機は口腔内に照射できるように小型化されているため、口腔内への応用は容易である。630と700 nmの赤色ライトはトルイジンブルーOやメチレンブルーなどの増感剤と併用することで歯周病原菌への殺菌作用を示したことが*in vivo*と*in vitro*の実験系で報告されている (Kumar et al., 2015)。しかし、歯周治療への効果を得るための照射量は非常に多く (6 - 20 J/cm²)、さらに特定の波長に反応する増感剤を併用することで発生するROSを利用している。つまり現在利用されているaPDTでは、十分な殺菌作用を得るためには上述したように、特別な増感剤が必要であり、増感剤による副作用も懸念される。

一方、310 nm UVBは増感剤が不必要であり、UVBの波長単体での使用で治療効果がある (Vatansever et al., 2013; Patrizi et al., 2015)。また、その作用は免疫抑制作用を利用した治療であるため、殺菌作用を必要とはしていない。最小紅斑の照射量をテストしたのちに照射量をあげながら最終的に高照射量を与えて免疫過剰な病変部の病原性T細胞をアポトーシス誘導し治療効果をしめしている (Schade et al., 2005; Shintani et al., 2008; Lapolla et al., 2011; Yamazaki et al., 2017)。本研究でも同様の波長を歯肉上皮細胞に与えているため、免疫抑制作用が起こる可能性も期待できる。歯周炎の組織でのTreg等の免疫抑制作用においてはまだ不明な点も多いが (ALI CEKICI et al., 2013)、310 nm UVB-LEDは弱い殺菌作用を示しながら、歯周組織に対しTregの発現を誘導し、免疫抑制作用によって過剰な炎症を抑えることで治療応用できる可能性も考えられ、さらなる検討の余地があると考ええる。

最後に、本実験で310 nm UVB-LEDの低照射量によって歯肉上皮細胞に細胞間接着因子の発現が誘導されることが明らかになった。Claudin-1は細胞間接着因子のうちタイトジャンクションに存在し、上皮のバリア機能を担う主要なタンパク質であり、Claudin-1のノックアウトマウスは1日も生存することができないことがわかっている (Furuse et al., 2002)。細胞間接着因子は、皮膚疾患や腫瘍などでその局在や発現量が変わることやウイルスの侵入時の媒体になることが知られており、疾患との関連性に関する研究が数多く報告されている (Groeger & Meyle, 2015)。歯周病との関連についても近年研究が続けられているが、歯周病病態と細胞間接着因子との関係について未だ詳しくは解明されていない (Furuse et al., 2002; Lourenco et al., 2010; Gursay et al., 2016)。しかしラットの歯周炎モデルの接合上皮において細胞間接着因子が発現抑制されたという報告もある (Fujita et al., 2012)。

本研究では細胞傷害性の起こらない範囲での照射量によって、歯肉上皮細胞にClaudin-1の発現を誘導した。Claudin-1は低酸素誘導因子 (HIF-1) によって発現されることが報告されている (Saeedi et al., 2015)。HIF-1は低酸素ストレスに対する細胞の適応応答として様々な生理現象を担っており、疾患の治療ターゲットとしても研究が行われている (Soni & Padwad, 2017)。またHIF-1がUVBによって発現誘導されるとの報告があり (Wunderlich et al., 2008)、本研究の結果から310 nm UVB-LEDによってHIF-1が誘導され、その結果 Claudin-1の発現が誘導された可能性が示唆される。この仮説についても、今後検討する予定である。以上のことから、310 nm UVB-LEDを歯周疾患部位や口腔粘膜に照射することで、上皮バリアを強化し、細菌の侵入や各種抗原による感作を抑制することで歯周炎の進行や発生を抑制できる可能性が示された。

V. 結論

310 nm UVB-LEDは、*P. gingivalis*に対して大量のCPD形成を誘導することで直接的な殺菌作用を示すとともに、口腔上皮細胞から活性酸素種の産生を誘導するにより間接的な殺菌作用を示す可能性が示唆された。また、105 mJ/cm²以下の310 nm UVB-LED照射は口腔上皮細胞への細胞傷害性は少なく、さらに同細胞の細胞接着因子の発現を誘導することで上皮バリア機能を高める可能性が示唆された。以上より、本機器は歯周炎の新しい治療や予防への応用が期待できる。

謝辞

本研究を進めるにあたりご指導を戴いた，国立長寿医療研究センター 口腔疾患口腔疾患研究部 部長 松下 健二 先生に感謝の意を表します．さらに，国立長寿医療研究センター 歯科・口腔先端診療開発部 部長 角 保徳 先生に有益なご討論ご助言を戴きましたことに感謝いたします．また，本学 歯学部 口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野の各位には研究遂行にあたり様々な面で日頃より支えて戴いただいたことをここに深く感謝の意を申し上げます．

文献

ALI CEKICI, KANTARCI. A, . HH & DYKE. TEV. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology* 2000 Vol. 64: 57–80, 2013.

Bagaitkar J, Demuth DR, Daep CA, Renaud DE, Pierce DL & Scott DA. Tobacco upregulates *P. gingivalis* fimbrial proteins which induce TLR2 hyposensitivity. *PLoS One* 5: e9323, 2010.

Batista LF, Kaina B, Meneghini R & Menck CF. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res* 681: 197-208, 2009a.

Batista LF, Roos WP, Kaina B & Menck CF. p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. *Mol Cancer Res* 7: 237-246, 2009b.

Braun A, Dehn C, Krause F & Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 35: 877-884, 2008.

Buerk. DG, A. K, Barbee. & Jaron. D. Nitric Oxide Signaling in the Microcirculation. *Crit Rev Biomed Eng* 2011 ; 39(5), 2011.

Chang EJ, Kundu JK, Liu L, Shin JW & Surh YJ. Ultraviolet B radiation activates NF-kappaB and induces iNOS expression in HR-1 hairless mouse skin: role of IkappaB kinase-beta. *Mol Carcinog* 50: 310-317, 2011.

Cieplik F, Spath A, Leibl C, Gollmer A, Regensburger J, Tabenski L, Hiller KA, Maisch T & Schmalz G. Blue light kills *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* due to its endogenous photosensitizers. *Clin Oral Investig* 18: 1763-1769, 2014.

Douki T CM, Sauvaigo S, Odin F, Cadet J. Formation of the main UV-induced thymine dimeric

lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. . J Biol Chem 2000 275: 11678-11685, 2000.

Ebersole JL, Kirakodu S, Novak MJ, Stromberg AJ, Shen S, Orraca L, Gonzalez-Martinez J, Burgos A & Gonzalez OA. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. J Clin Periodontol 41: 853-861, 2014.

Fujita T, Firth JD, Kittaka M, Ekuni D, Kurihara H & Putnins EE. Loss of claudin-1 in lipopolysaccharide-treated periodontal epithelium. J Periodontal Res 47: 222-227, 2012.

Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A & Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. J Cell Biol 156: 1099-1111, 2002.

Fyrestam J, Bjurshammar N, Paulsson E, Mansouri N, Johannsen A & Ostman C. Influence of culture conditions on porphyrin production in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Photodiagnosis Photodyn Ther 17: 115-123, 2017.

Ge X, Kitten T, Chen Z, Lee SP, Munro CL & Xu P. Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence. Infect Immun 76: 2551-2559, 2008.

Groeger SE & Meyle J. Epithelial barrier and oral bacterial infection. Periodontol 2000 69: 46-67, 2015.

Gupta A, Avci P, Dai T, Huang YY & Hamblin MR. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. Adv Wound Care (New Rochelle) 2: 422-437, 2013.

Gursoy UK, Zeidan-Chulia F, Yilmaz D, Ozdemir V, Maki-Petays J, Neves de Oliveira BH, Firatli Y, Guncu GN, Caglayan F & Kononen E. Analyses of Gingival Adhesion Molecules in

Periodontitis: Theoretical In Silico, Comparative In Vivo, and Explanatory In Vitro Models. J Periodontol 87: 193-202, 2016.

Haag PA, Steiger-Ronay V & Schmidlin PR. The in Vitro Antimicrobial Efficacy of PDT against Periodontopathogenic Bacteria. Int J Mol Sci 16: 27327-27338, 2015.

Henningham A, Dohrmann S, Nizet V & Cole JN. Mechanisms of group A *Streptococcus* resistance to reactive oxygen species. FEMS Microbiol Rev 39: 488-508, 2015.

Jordan T. UVC irradiation. Is it the future of infection prevention in the clinical laboratory? MLO Med Lab Obs 47: 41, 2015.

Karthikeyan B, Talwar, Arun KV & Kalaivani S. Evaluation of transcription factor that regulates T helper 17 and regulatory T cells function in periodontal health and disease. J Pharm Bioallied Sci 7: S672-676, 2015.

Kim S, Kim J, Lim W, Jeon S, Kim O, Koh JT, Kim CS, Choi H & Kim O. In vitro bactericidal effects of 625, 525, and 425 nm wavelength (red, green, and blue) light-emitting diode irradiation. Photomed Laser Surg 31: 554-562, 2013.

Kreth J, Zhang Y & Herzberg MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 190: 4632-4640, 2008.

Kumar V, Sinha J, Verma N, Nayan K, Saimbi CS & Tripathi AK. Scope of photodynamic therapy in periodontics. Indian J Dent Res 26: 439-442, 2015.

Lapolla W, Yentzer BA, Bagel J, Halvorson CR & Feldman SR. A review of phototherapy protocols for psoriasis treatment. J Am Acad Dermatol 64: 936-949, 2011.

Lourenco SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Pereira CM, Carvalho AL, Kowalski LP & Soares FA. Oral squamous cell carcinoma: status of tight junction claudins in the different histopathological patterns and relationship with clinical parameters. A tissue-microarray-based study of 136 cases. *J Clin Pathol* 63: 609-614, 2010.

Lynch MC & Kuramitsu HK. Role of superoxide dismutase activity in the physiology of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 67: 3367-3375, 1999.

McKenzie RM, Johnson NA, Aruni W, Dou Y, Masinde G & Fletcher HM. Differential response of *Porphyromonas gingivalis* to varying levels and duration of hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Microbiology* 158: 2465-2479, 2012.

Munn. SJ, Allanou. R, Aschberger. K, Berthault. F, Bruijn. Jd, Musset. C, O'Connor. S, S. Pakalin, Paya-Perez. A, Pellegrini. G, Scheer. S & Vegro. S. European Union Risk Assessment Report
HYDROGEN PEROXIDE. European Union Risk Assessment Report Volume 38, 2003.

Patrizi A, Raone B & Ravaioli GM. Management of atopic dermatitis: safety and efficacy of phototherapy. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 8: 511-520, 2015.

Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E & Sage E. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem* 275: 26732-26742, 2000.

Polefka TG, Meyer TA, Agin PP & Bianchini RJ. Effects of solar radiation on the skin. *J Cosmet Dermatol* 11: 134-143, 2012.

Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB & Sinha RP. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids* 2010: 592980, 2010.

Ren C, McGrath C, Jin L, Zhang C & Yang Y. The effectiveness of low-level laser therapy as an

adjunct to non-surgical periodontal treatment: a meta-analysis. *J Periodontal Res* 52: 8-20, 2017.

S.P.Tongeren, J.E.Degener & H.J.M.Harmsen. Comparisin of three rapid and easy bacterial DNA extraction methods for use with quantitative real-time PCR
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30(9): 1053-1061, 2012.

Saeedi BJ, Kao DJ, Kitzenberg DA, Dobrinskikh E, Schwisow KD, Masterson JC, Kendrick AA, Kelly CJ, Bayless AJ, Kominsky DJ, Campbell EL, Kuhn KA, Furuta GT, Colgan SP & Glover LE. HIF-dependent regulation of claudin-1 is central to intestinal epithelial tight junction integrity. *Mol Biol Cell* 26: 2252-2262, 2015.

Schade N, Esser C & Krutmann J. Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: molecular mechanisms and cellular alterations. *Photochem Photobiol Sci* 4: 699-708, 2005.

Schallreuter KU, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Gaze DC, Tobin DJ, Marshall HS, Panske A, Panzig E & Hibberts NA. In Vivo and In Vitro Evidence for Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Accumulation in the Epidermis of Patients with Vitiligo and its Successful Removal by a UVB-Activated Pseudocatalase. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 4: 91-96, 1999.

Schweintzger N, Gruber-Wackernagel A, Reginato E, Bambach I, Quehenberger F, Byrne SN & Wolf P. Levels and function of regulatory T cells in patients with polymorphic light eruption: relation to photohardening. *Br J Dermatol* 173: 519-526, 2015.

Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Graziani F, Gatto R & Monaco A. Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 40: 514-526, 2013.

Shikama Y, Kudo Y, Ishimaru N & Funaki M. Possible Involvement of Palmitate in Pathogenesis of Periodontitis. *J Cell Physiol* 230: 2981-2989, 2015.

Shintani Y, Yasuda Y, Kobayashi K, Maeda A & Morita A. Narrowband ultraviolet B radiation suppresses contact hypersensitivity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 24: 32-37, 2008.

Shintani. Y, Yoko. Y & Kobayashi. K. Narrowband ultraviolet B radiation suppresses contact hypersensitivity. *Photoimmunology & Photomedicine*, 2007.

Signat B, Roques C, Poulet P & Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 13: 25-36, 2011.

Soni S & Padwad YS. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncol* 56: 503-515, 2017.

Svobodova A, Walterova D & Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150: 25-38, 2006.

UDO REISCHL, HANS-JOˆRG LINDE & METZ M. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Species Confirmation Using Real-Time Fluorescence PCR. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* June 2000: 2429-2433, 2000.

Vangipuram R & Feldman SR. Ultraviolet phototherapy for cutaneous diseases: a concise review. *Oral Dis* 22: 253-259, 2016.

Vatansever F, Ferraresi C, de Sousa MV, Yin R, Rineh A, Sharma SK & Hamblin MR. Can biowarfare agents be defeated with light? *Virulence* 4: 796-825, 2013.

Wang L, Wang J, Jin Y, Gao H & Lin X. Oral administration of all-trans retinoic acid suppresses experimental periodontitis by modulating the Th17/Treg imbalance. *J Periodontol* 85: 740-750, 2014.

Wang L, Guan N, Jin Y, Lin X & Gao H. Subcutaneous vaccination with *Porphyromonas gingivalis* ameliorates periodontitis by modulating Th17/Treg imbalance in a murine model. Int Immunopharmacol 25: 65-73, 2015.

Wunderlich L, Paragh G, Wikonkal NM, Banhegyi G, Karpati S & Mandl J. UVB induces a biphasic response of HIF-1alpha in cultured human keratinocytes. Exp Dermatol 17: 335-342, 2008.

Yamaguchi M, Noiri Y, Kuboniwa M, Yamamoto R, Asahi Y, Maezono H, Hayashi M & Ebisu S. *Porphyromonas gingivalis* biofilms persist after chlorhexidine treatment. Eur J Oral Sci 121: 162-168, 2013.

Yamazaki S, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S & Morita A. Ultraviolet B-Induced Maturation of CD11b-Type Langerin(-) Dendritic Cells Controls the Expansion of Foxp3(+) Regulatory T Cells in the Skin. J Immunol, 2017.

表・付図

(A) 310 nm UVB-LED照射器1

時間 (秒)	10	30	60	120	280	240
mJ/cm ²	17.5	52.5	105	210	315	420

(B) 310 nm UVB-LED照射器2

時間 (秒)	6	12	18	24	60
mJ/cm ²	105	210	315	420	1050

表1.各 310 nm UVB-LED 照射器の各時間での照射量
実験に使用した照射量の計算は以下の計算式にて求めた.
照射量 (mJ/cm²) = 照射照度 (mW/cm²) × 照射時間 (秒)
照射照度:照射器1 = 1.75 mW/cm², 照射器2 = 17.5mJ/cm²



(A) 310 nm UVB-LED照射器1



(B) 310 nm UVB-LED照射器2

図1. 310 nm 試作UVB - LED照射器1と2

照射器2は照射器1よりも高線量を短時間で照射可能に改良されている。

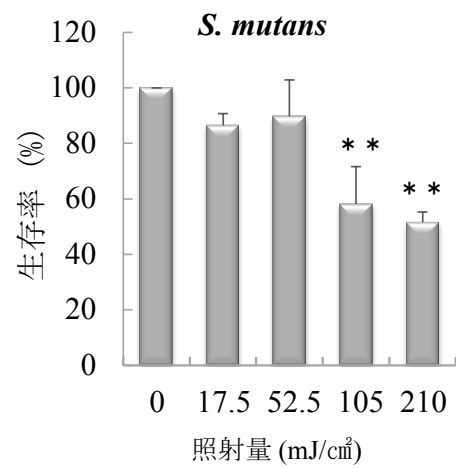
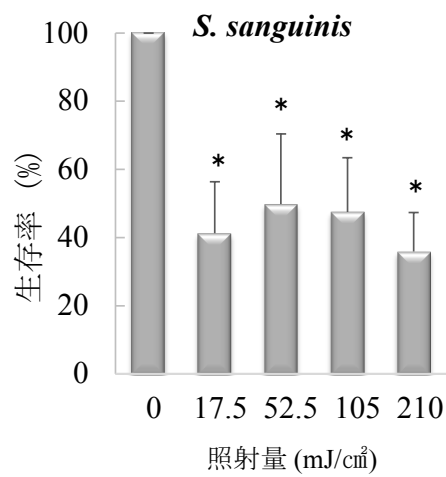
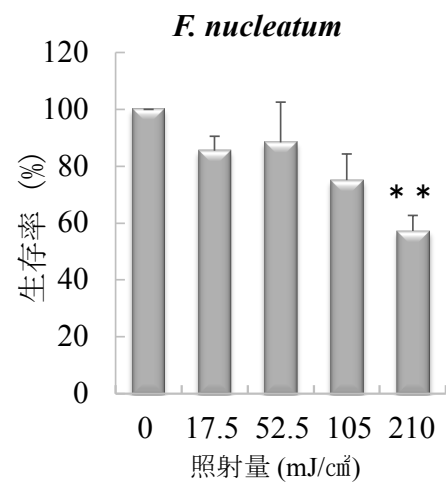
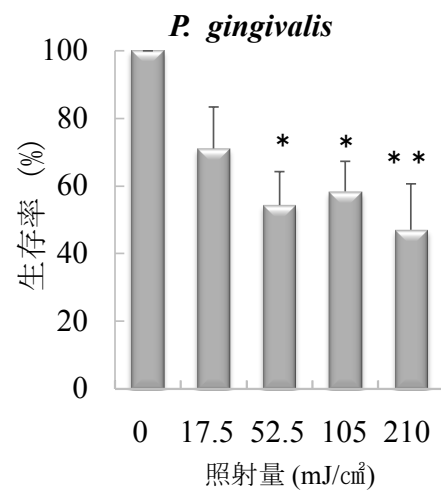


図2. 310 nm UVB-LEDの口腔内細菌への殺菌作用 (310 nm UVB-LED照射機1) 120 秒間, 210 mJ/cm²のUVB-LED照射によって全供試菌が約50%前後まで殺菌された. (n = 3 or 5, means ± SE; ** $P < 0.01$ vs. 0 mJ/cm², * $P < 0.05$ vs. 0 mJ/cm²)

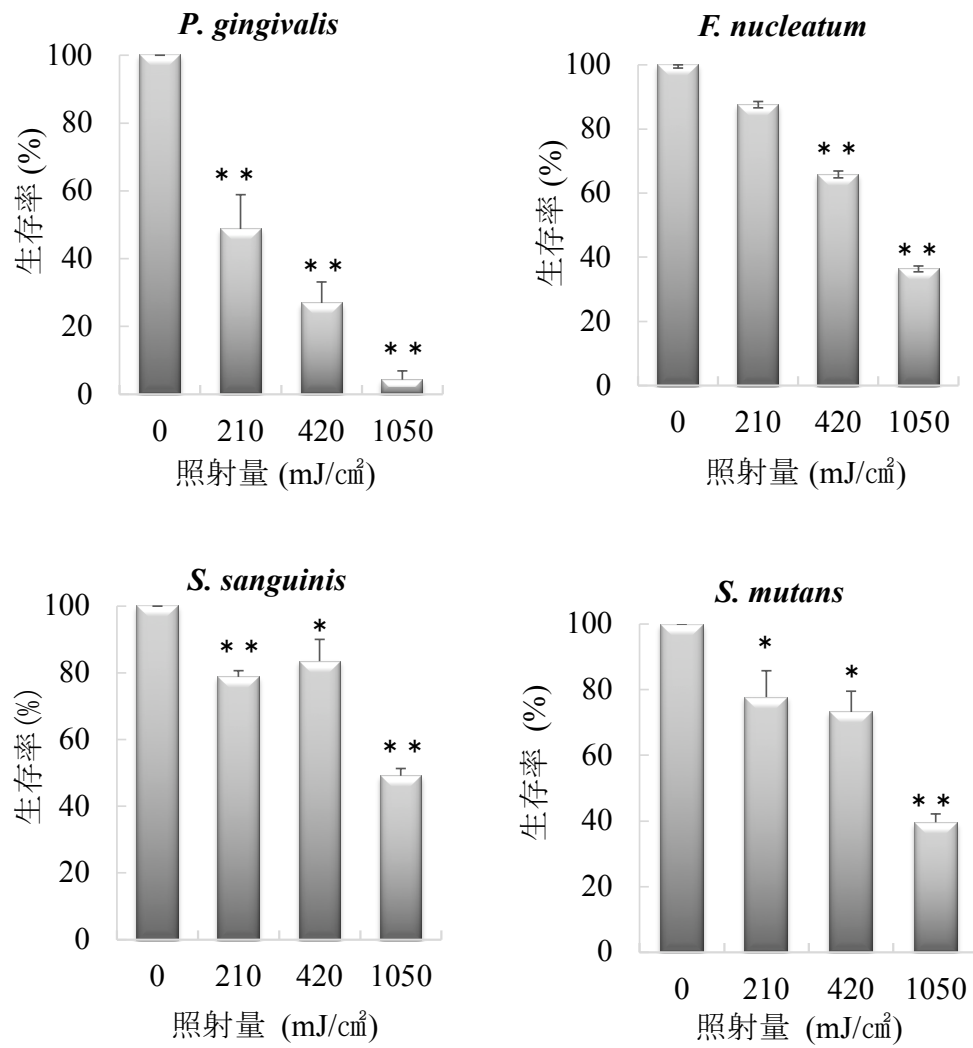
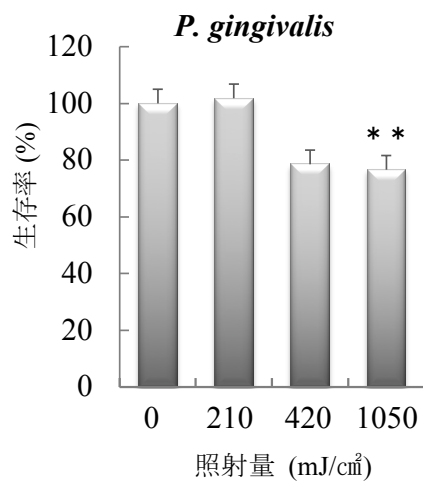
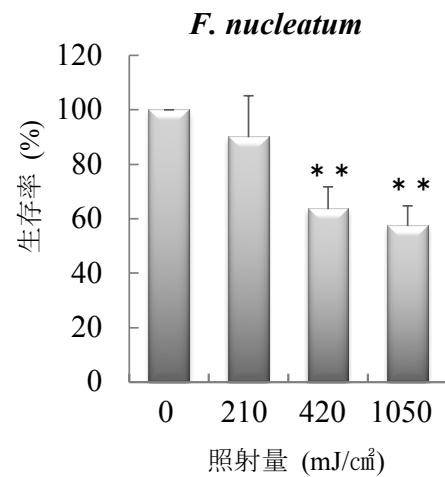


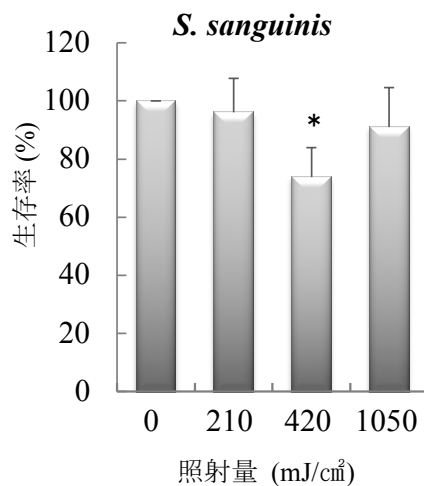
図3. 310 nm UVB-LEDの高照射量による口腔内細菌への殺菌作用 (310 nm UVB-LED照射機2) 1050 mJ/cm²の照射によって、供試菌の全てに殺菌作用を示した. 特に *P. gingivalis* は他の菌と比較して強く殺菌された. (n = 3 or 5, means ± SE; ***P* < 0.01 vs. 0 mJ/cm², **P* < 0.05 vs. 0 mJ/cm²)



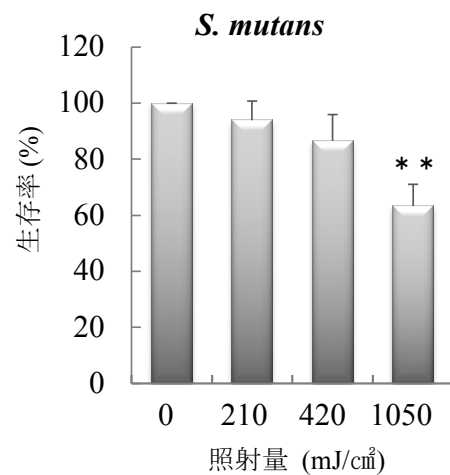
n = 12, means ± SE; * $P < 0.05$ vs. 0 mJ/cm²



n = 8, means ± SE; * $P < 0.05$ vs. 0 mJ/cm²



n = 9, means ± SE; * $P < 0.05$ vs. 0 mJ/cm²



n = 9, means ± SE; ** $P < 0.01$ vs. 0 mJ/cm²

図4. 310 nm UVB-LEDの高照射量による口腔内細菌 (バイオフィルム培養系) への殺菌作用(310 nm UVB-LED照射機2). 420, 1050 mJ/cm²の照射によって, 供試菌の全てに殺菌作用を示した. (n = 8 - 12, means ± SE; ** $P < 0.01$ vs 0 mJ/cm², * $P < 0.05$ vs. 0 mJ/cm²)

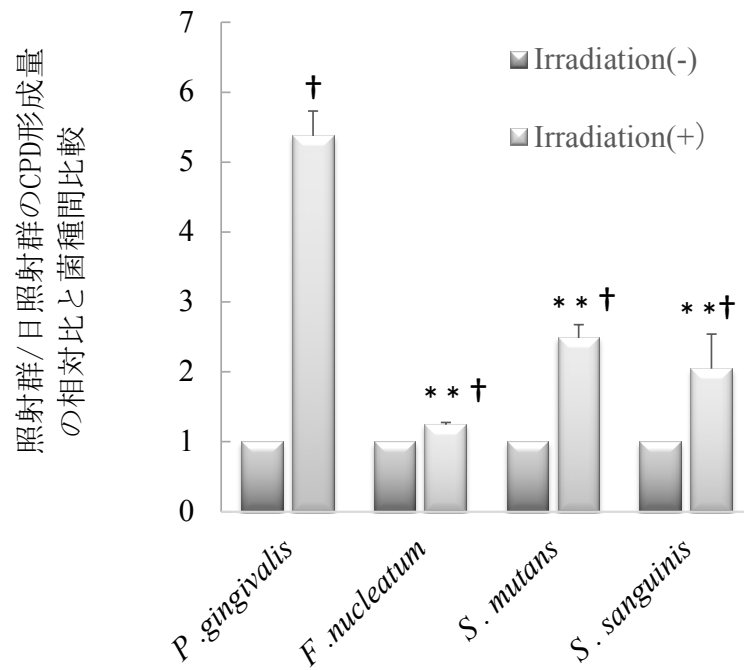


図5. 310 nm UVB-LEDによる口腔細菌DNAのCPD形成. 1050 mJ/cm²の照射によって、供試菌の全てにCPDが形成された. さらに*P. gingivalis*は他の3菌より有意に多くのCPDが形成された. (n = 3, means ± SE; ***P* < 0.01 vs. *P. gingivalis*, †*P* < 0.01 vs 非照射群)

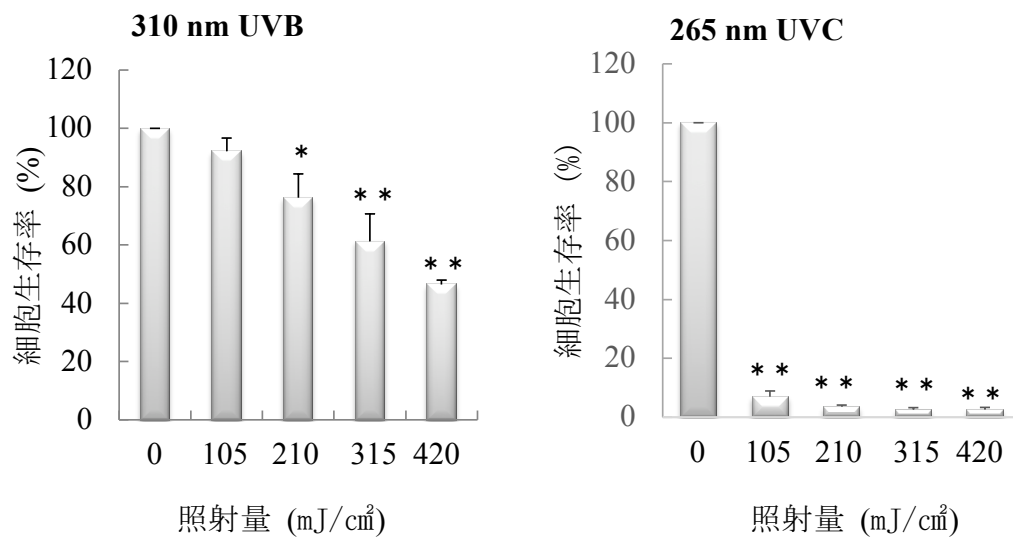
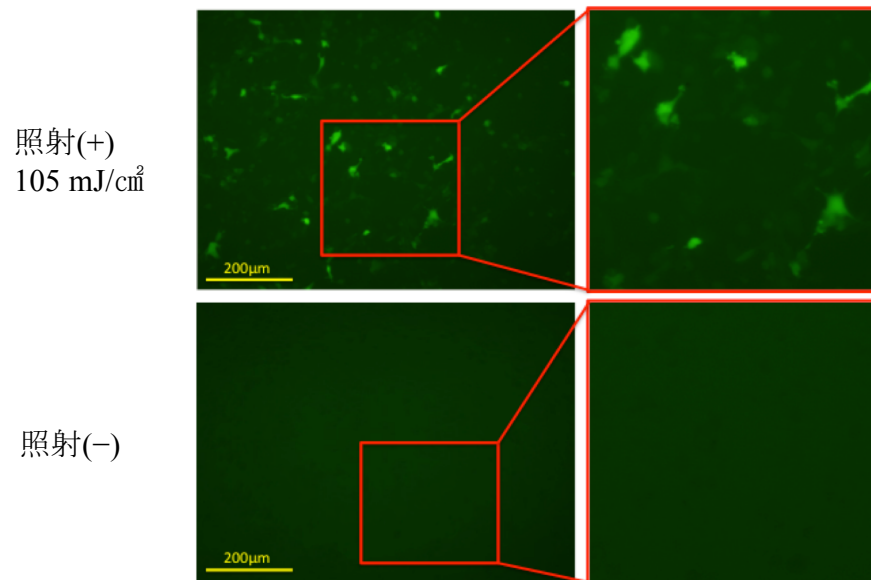


図6.上皮細胞へのUVB-LEDの細胞傷害性

Ca9-22 細胞への細胞傷害性を示す. 310 nm UVB-LEDは105 mJ/cm²までの照射量 (60秒間) に細胞傷害性を示さなかった. 265 nm UVC-LEDは強い細胞傷害性を示した. また, 310 nm UVB-LEDがLD50を示す照射量は401.8 mJ/cm² (229.6秒間) であった. (n = 3, means ± SE; ***P* < 0.01 vs. 0 mJ/cm², **P* < 0.05 vs. 0 mJ/cm²)

(A)



(B)

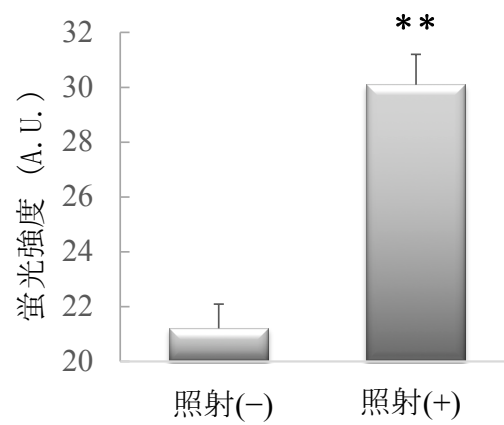
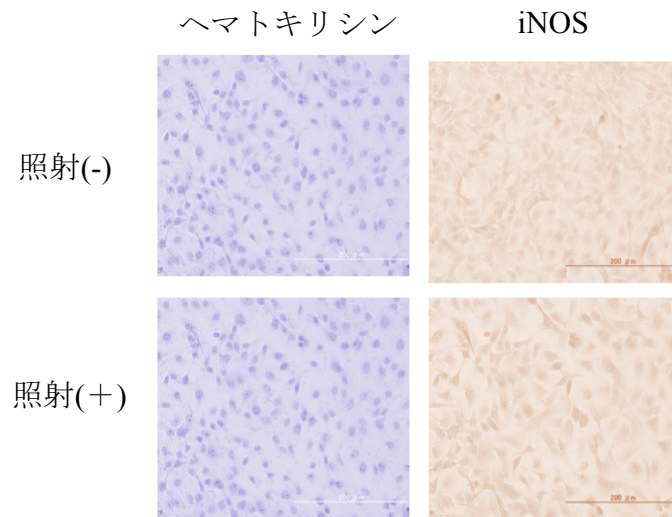


図7. 310 nm UVB-LED 照射による口腔上皮細胞からのNO産生
(A) Ca9-22 細胞へ310 nm UVB-LEDを105 mJ/cm²照射後の24時間後のNO 産生を蛍光染色して観察した. (B) 蛍光強度をImage Jを使用してグラフ化した. (n = 3, means ± SE; **P < 0.01)

(A)



(B)

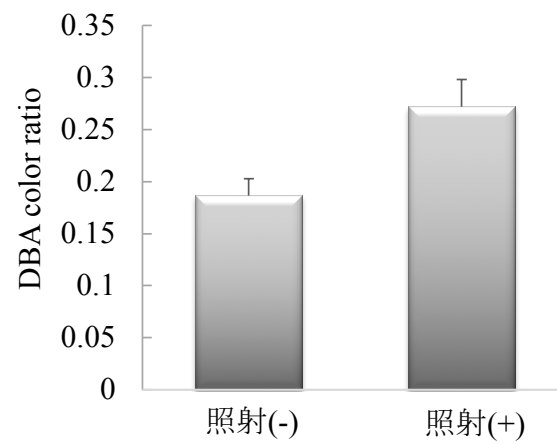


図8. 310 nm UVB-LED 照射による口腔上皮細胞へのiNOS 発現の検討.
(A) Ca9-22 細胞へ310 nm UVB-LEDを60秒間照射後の24時間後のiNOS産生を免疫染色して観察した. (B) DAB にて染色された割合を Image Jを利用してグラフ化した. (n = 3, means \pm SE; $P = 0.0503$)

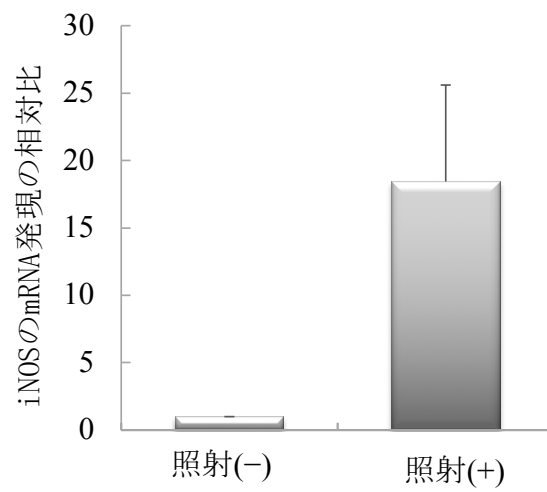


図9. 310 nm UVB-LED 照射による口腔上皮細胞のiNOSのmRNAの発現
Ca9-22細胞へ310 nm UVB-LEDを105 mJ/cm²照射後の24時間後のiNOSのmRNA発現をReal-time PCRによって定量した. RNAの発現は $\Delta\Delta$ 法によって比較した.
(n = 3, means \pm SE; $P = 0.071$)

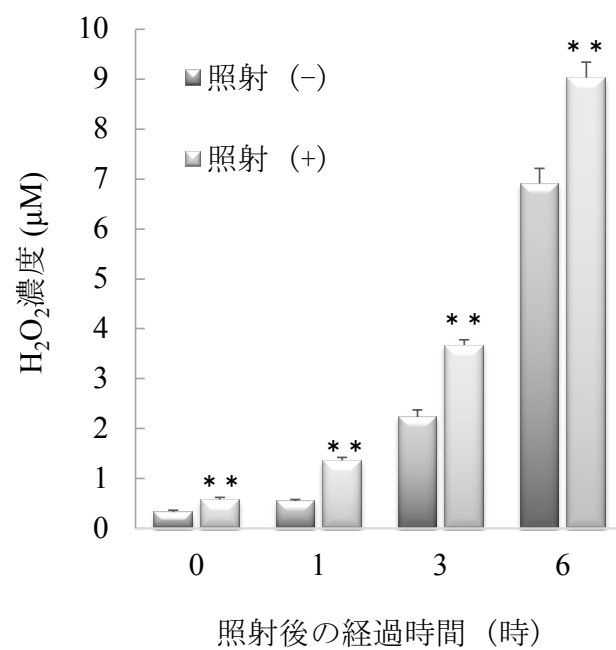


図10. 310 nm UVB-LED 照射による口腔上皮細胞からの H_2O_2 の産生. Ca9-22 細胞への310 nm UVB-LEDの照射 ($105\text{mJ}/\text{cm}^2$) によって0 - 6時間の間, 同細胞から H_2O_2 が産生された. ($n = 4$, means \pm SE; ** $P < 0.01$ vs. 照射(-))

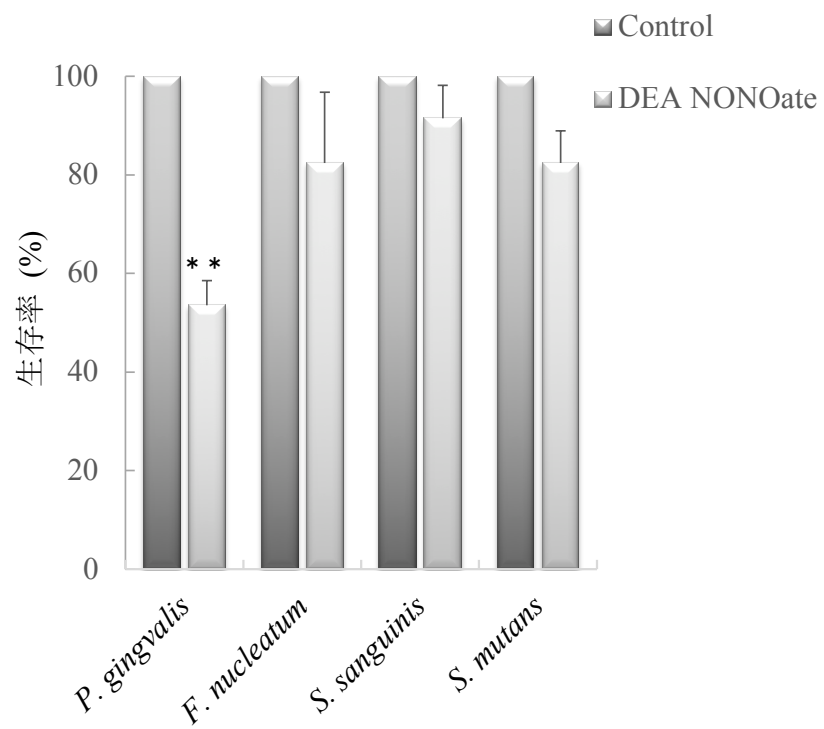


図11. NOの口腔細菌への殺菌作用. 各菌液 ($OD_{600} = 0.4-0.5$) に $10 \mu M$ の DEA NONOate を1時間作用させた時の殺菌作用を示す. *P. gingivalis*に殺菌作用を示した. ($n = 3$, means \pm SE; $**P < 0.01$ vs. Control)

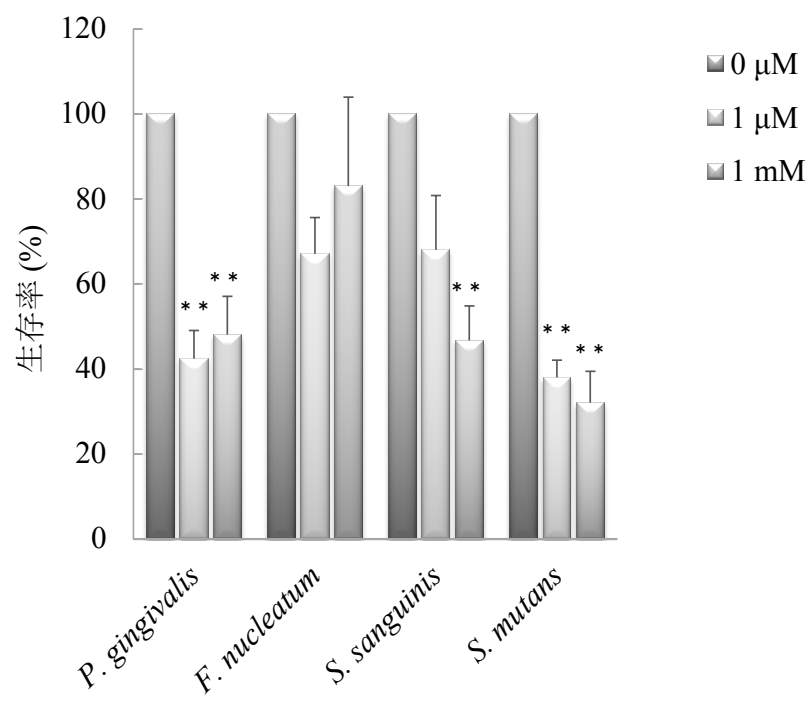


図12. H_2O_2 の口腔細菌への殺菌作用. 各菌液 ($\text{OD}_{600} = 0.4 - 0.5$) に H_2O_2 (1 μM または 1 mM) を1時間作用させた後の殺菌作用を示す. *P. gingivalis* は低濃度の H_2O_2 で殺菌された. (n = 3, means \pm SE; ** $P < 0.01$ vs. 0 μM , * $P < 0.05$ vs. 0 μM)

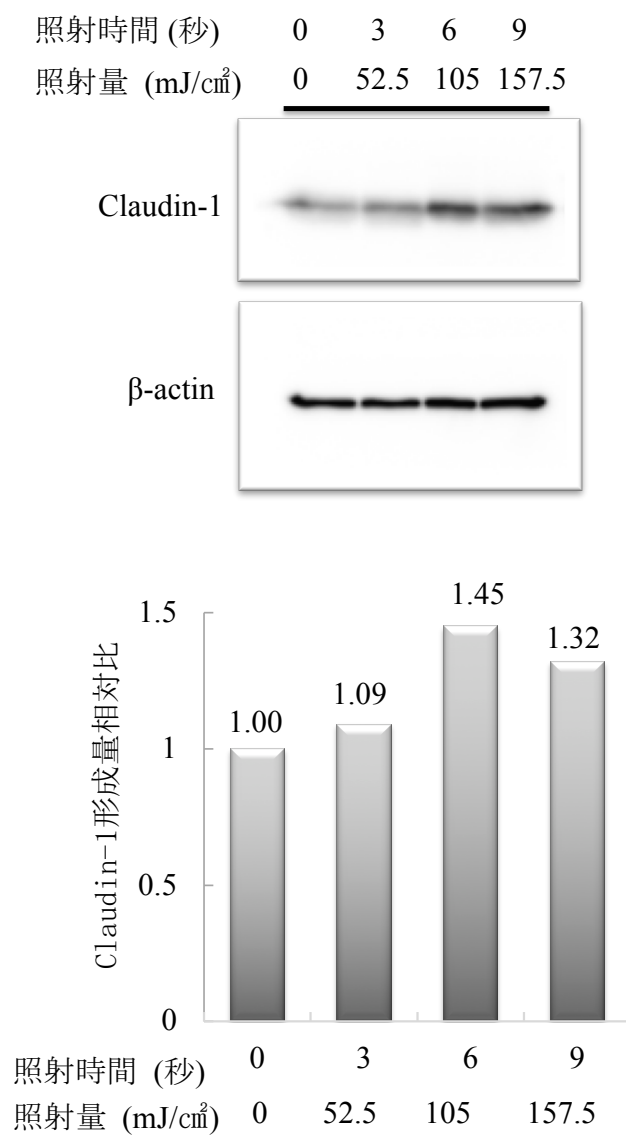


図13. 310 nm UVB-LED 照射による口腔上皮細胞へのClaudin-1の発現. OBA-9細胞へ310 nm UVB-LEDを各間照射後の48時間後のClaudin-1タンパクの形成をウェスタンブロッティング法によって確認した. 照射によって口腔上皮細胞にClaudin-1の形成が誘導された. (n = 3のうちの1つの結果)